

(51)

Int. Cl. 2:

C 07 C 103/52

A 61 K 37/02

(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DEUTSCHES



PATENTAMT

DT 22 09 835 B2

(11)

# Auslegeschrift 22 09 835

(21)

Aktenzeichen: P 22 09 835.7-42

(22)

Anmeldetag: 1. 3. 72

(43)

Offenlegungstag: 6. 9. 73

(44)

Bekanntmachungstag: 29. 4. 76

(30)

Unionspriorität:

(32) (33) (31) —

(54)

Bezeichnung:

Insulinderivate, Verfahren zu ihrer Herstellung sowie diese enthaltende Arzneimittel

(71)

Anmelder:

Bayer AG, 5090 Leverkusen

(72)

Erfinder:

Brandenburg, Dietrich, Dipl.-Chem. Dr., 5101 Schmithof; Puls, Walter, Dr., 5600 Wuppertal

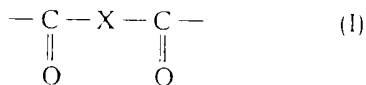
(56)

Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften:  
Nichts ermittelt

22 09 835

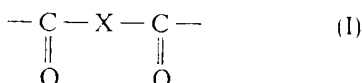
## Patentansprüche:

1. Bifunktionell vernetzte Insulinderivate, in welchen die  $\alpha$ -Aminogruppe von Glycin<sup>A1</sup> der A-Kette mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysin<sup>B29</sup> der B-Kette durch eine Dicarbonsäurebrücke der Formel

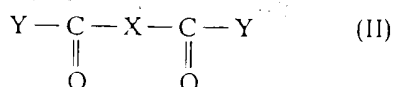


verknüpft ist, wobei X für eine direkte Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung, eine aliphatische Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 15 C-Atomen, in der gegebenenfalls ein oder mehrere Kohlenstoffatome durch Heteroatome oder Heteroatomgruppen ersetzt sind, und deren weitere Valenzen entweder nur mit Wasserstoffatomen oder mit Wasserstoffatomen und hydrophilen Gruppen abgesättigt sind, steht.

2. Verfahren zur Herstellung von bifunktionell vernetzten Insulinderivaten, in welchen die  $\alpha$ -Aminogruppe von Glycin<sup>A1</sup> der A-Kette mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysin<sup>B29</sup> der B-Kette durch eine Dicarbonsäurebrücke der Formel



verknüpft ist, wobei X für eine direkte Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung, eine aliphatische Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 15 C-Atomen, in der gegebenenfalls ein oder mehrere Kohlenstoffatome durch Heteroatome oder Heteroatomgruppen ersetzt sind, und deren weitere Valenzen entweder nur mit Wasserstoffatomen oder mit Wasserstoffatomen und hydrophilen Gruppen abgesättigt sind, steht, dadurch gekennzeichnet, daß man Insulin mit aktivierten Derivaten von Dicarbonsäuren der allgemeinen Formel



wobei X die oben angegebene Bedeutung besitzt und Y für einen die Carbonsäuregruppe aktivierenden Rest steht, in polaren organischen Lösungsmitteln oder in Mischung organischer Lösungsmittel mit Wasser, in Gegenwart von Protonenakzeptoren unter Verdünnungsbedingungen umsetzt und die erhaltenen Reaktionsprodukte durch Trennverfahren isoliert, die einmal nach der Molekülgröße und zum anderen nach der Ladung differenzieren.

3. Arzneimittel, gekennzeichnet durch einen Gehalt an mindestens einem Insulin-Derivat,

Es ist bereits bekanntgeworden, daß sich Insulin mittels monofunktionaler Reagenzien chemisch modifizieren läßt, daß sich auf diese Weise hergestellten Insulin-Derivaten durch die einheitliche Form gewinnen lassen und daß derartige Insulinderivate veränderte biologische Eigenschaften besitzen (s. zum Beispiel

D. Levy und F. H. Carpenter, Biochemistry, 6, 3559 [1967]; D. G. Lindsay und S. Shall, Biochem. J., 121, 737 [1971]; B. Africa und F. H. Carpenter, Biochemistry, 9, 1962 [1970]).

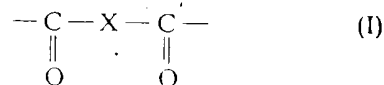
Über eine therapeutische Verwendung dieser Umsetzungsprodukte von Insulin mit monofunktionalen Reagenzien ist bisher jedoch noch nichts bekanntgeworden.

Bei der Umsetzung von Insulin mit bifunktionellen

Reagenzien konnten bisher nur heterogene Mischungen und keine einheitlichen Reaktionsprodukte erhalten werden (s. zum Beispiel DL-PS 10002; H. Zahn und J. Meienhofer, Makromol. Chem., 26, 153 [1958]). Hierbei reagierten die Reagenzien immer mit verschiedenen funktionellen Gruppen des Insulinmoleküls, und neben monomeren Derivaten entstanden auch höhermolekulare Produkte mit unbestimmtem Polymerisationsgrad (s. zum Beispiel DL-PS 10002).

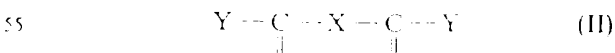
Die beiden bisher bekannten einheitlichen Insulinderivate mit einer intramolekularen m-Phenylendithiocarbamoylbrücke erwiesen sich als biologisch inaktiv (D. Brandenburg, H. G. Gattner, M. Weinert, L. Herbertz, H. Zahn und A. Wollmer, Diabetes, Proc. 7th Congress Int. Diabetes Fed. Buenos Aires, 1970. Excerpta Medica Int. Congr. Series, 231, 363 [1971]).

Es wurde gefunden, daß die neuen, bifunktionell vernetzten Insulinderivate, in welchen die  $\alpha$ -Aminogruppe von Glycin<sup>A1</sup> der A-Kette mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysin<sup>B29</sup> der B-Kette des Insulinmoleküls durch eine Dicarbonsäurebrücke der Formel



verknüpft ist, wobei X für eine direkte Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung, eine aliphatische Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 15 C-Atomen, in der gegebenenfalls ein oder mehrere Kohlenstoffatome durch Heteroatome bzw. Heteroatomgruppen ersetzt sind, und deren weitere Valenzen entweder nur mit Wasserstoffatomen oder mit Wasserstoffatomen und hydrophilen Gruppen abgesättigt sind, steht, eine hohe zuckersenkende Wirkung aufweisen.

Weiterhin wurde gefunden, daß man vernetzte Insuline, in welchen die  $\alpha$ -Aminogruppe von Glycin<sup>A1</sup> mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysin<sup>B29</sup> durch eine Dicarbonsäurebrücke der Formel I verknüpft ist, wobei X die oben angegebene Bedeutung besitzt, erhält, wenn man Insulin mit aktivierten Derivaten von Dicarbonsäuren der allgemeinen Formel



umsetzt, in polaren organischen Lösungsmitteln oder in Mischung organischer Lösungsmittel mit Wasser, in Gegenwart von Protonenakzeptoren unter Verdünnungsbedingungen umsetzt und die erhaltenen Reaktionsprodukte durch Trennverfahren isoliert, die einmal nach der Molekülgröße und zum anderen nach der Ladung differenzieren.

Überraschenderweise werden bei der erfindungs-

gemäß Vernetzungsreaktion allein intramolekular vernetzte Insulinderivate gebildet, in denen die Aminogruppen von Glycin<sup>41</sup> und Lysin<sup>829</sup> verknüpft sind. So konnte auf den temporären Schutz der Phenylalanin<sup>81</sup>-Aminogruppe verzichtet werden, obwohl nach dem Stand der Technik erwartet werden mußte, daß diese Aminogruppe in hohem Ausmaß substituiert würde (D. G. Lindsay und S. Hall, Biochem. J., 121, 737 [1971]; D. Levy und F. H. Carpenter, Biochemistry, 6, 3559 [1967]). Ebenso unerwartet ist, daß Nebenreaktionen an Tyrosin- und Serin-OH-Gruppen (H. Zahn und F. Schade, Angew. Chem., 75, 377 [1963]) nicht auftraten.

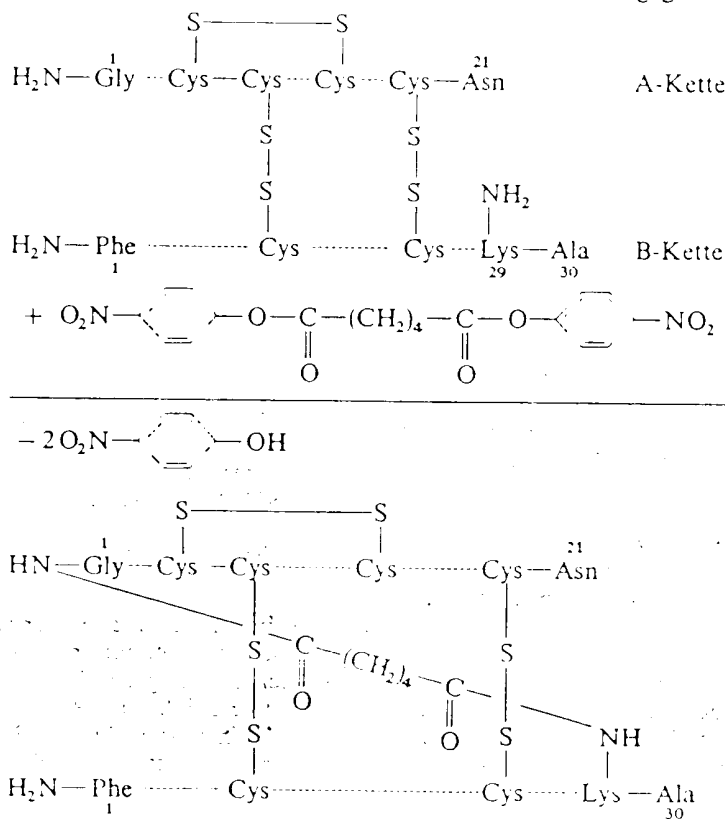
Es ist ferner sehr überraschend, daß die erfindungsgemäßen Insulinderivate eine höhere blutzucker-

substituierten, bekannten Insulinderivate besitzen und eine wesentlich höhere blutzuckersenkende Wirkung als die bisher bekanntgewordenen bifunktionell vernetzten Insuline aufweisen.

Besonders günstig ist der unerwartete Befund, daß die erfindungsgemäßen Insulinderivate aus zinksalz-haltigen Lösungen kristallisiert werden können. So ergibt sich die Möglichkeit einer Applikation in Form von Kristallsuspensionen, die bei Insulin bekanntlich im Hinblick auf eine protrahierte Wirkung angewandt wird.

Die erfindungsgemäßen Stoffe stellen somit eine Bereicherung der Pharmazie dar.

Verwendet man Rinderinsulin und Adipinsäure-bis-p-nitrophenylester als Ausgangsstoffe, so kann der Reaktionsablauf durch das folgende vereinfachte Formelschema wiedergegeben werden:



In den Formeln I und II steht X vorzugsweise für  $-(\text{CH}_2)_n-$ , wobei  $n$  eine ganze Zahl sowie Null bedeuten kann. Y steht vorzugsweise für gegebenenfalls substituiertes Phenoxy.

Die erfindungsgemäß verwendbaren bifunktionellen Verbindungen sind bereits bekannt oder können nach bekannten Verfahren hergestellt werden (H. Zahn und F. Schade, Chem. Ber., 96, 1747 [1963]; J. Schnell und H. Zahn, Kolloid-Z., 203, 27 [1965]; H. Zahn und M. Bahra, Forschungsergebnisse des Landes Nordrhein-Westfalen, 1965).

aktiviert ist, wie Adipinsäure-bis-p-nitrophenylester, Pimelinsäure-bis-N-hydroxysuccinimidester, Korksäure-bis-2,4,5-trichlorphenylester, Sebacinsäure-bis-pentachlorphenylester, sowie Aminosäuren, die zwei Carboxylgruppen in aktivierter Form besitzen und in denen die Aminogruppe(n) geschützt ist, wie N,N'-Bis-tert.-butyloxycarbonyl-cystin-bis-2,4,5-trichlorphenylester, N-Benzoyloxycarbonyl-glutaminsäure- $\alpha$ -bis-p-nitrophenylester.

Als Insuline können beispielsweise verwandt werden:

Als Beispiele seien genannt

Derivate aliphatischer Dicarbonsäuren der allgemeinen Formel

den Insulin löst, sowie Mischungen dieser Lösungsmittel mit Wasser. Als Beispiele seien Dimethylsulfoxid und Dimethylformamid genannt.

Als Protonakzeptoren können alle bei der Peptidkondensation benutzten basischen Verbindungen verwendet werden, wie organische Basen wie Trimethylamin, N-Methylmorpholin (die letztere vorzugsweise

beim Arbeiten mit optisch aktiver Carbonsäure zur Vermeidung von Racemisierung), beim Arbeiten in Gegenwart von Wasser auch Alkalihydroxyde, Hydrogencarbonate oder Carbonate, wie Natriumhydrogencarbonat oder Natriumcarbonat.

Im allgemeinen arbeitet man bei Temperaturen zwischen 0 und 40°C, vorzugsweise bei 18 bis 25°C.

Die Reaktionen werden üblicherweise bei Normaldruck durchgeführt.

Bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens setzt man auf 1 Mol Kristallinsulin oder amorphes Insulin 1 bis 2 Mol, vorzugsweise 1,2 bis 1,3 Mol, des aktivierten Dicarbonsäurederivates ein, und zwar so, daß in die verdünnte Lösung des Insulins die Lösung des aktivierten Derivates langsam eingetropft wird, üblicherweise während 1 bis 5 Stunden. Sodann läßt man die Reaktionsmischung noch mehrere Stunden, gegebenenfalls unter Rühren, stehen. Günstig, jedoch nicht notwendig, ist Licht- und Sauerstoffausschluß, d. h. Arbeiten im Dunkeln und unter Schutzgas (z. B. Stickstoff) zur Vermeidung von Nebenreaktionen (z. B. von oxydativen Schädigungen des Insulins).

Die Aufarbeitung erfolgt entweder durch Ausfällen der Insulinderivate durch Zugabe von mit dem Lösungsmittel mischbaren Lösungsmitteln, welche die Eigenschaft besitzen, die Insulinderivate auszufällen, beispielsweise Methanol und Äther. Man kann auch die Reaktionslösung im Dialyseschlauch gegen Wasser dialysieren und so die Insulinderivate abtrennen. Zum Abbruch der Reaktion kann vor Beginn der Dialyse angesäuert werden, z. B. mit Essigsäure. Als günstig hat sich auch eine Dialyse gegen verdünnte Ammoniumbicarbonatlösung erwiesen, wobei restliche aktivierte Gruppen der Dicarbonsäure aminolysiert werden.

Nach der Dialyse wird entweder direkt lyophilisiert, oder das Insulinderivat wird durch Einstellung des pH-Wertes auf den isoelektrischen Punkt ausgefällt.

Das Präparat wird sodann entweder feucht oder nach Trocknung mittels eines Verfahrens fraktioniert, das Moleküle nach dem Molekulargewicht trennt, vorzugsweise durch Gelchromatographie unter Bedingungen, bei denen Insulin und die Derivate nicht aggregieren. Zum Beispiel wird hierbei Sepha-

dex G-50 fine in 10%iger Essigsäure verwendet. Das nach Dialyse und Gefriertrocknung erhaltene Präparat (Monomerfraktion 3, vgl. Beispiele) wird weiter nach Verfahren fraktioniert, die Moleküle nach der

Ladung aufzutrennen. Hierzu können Ionenaustauschchromatographie oder elektrophoretische Verfahren dienen. Vorzugsweise wird im sauren Medium eine Ionenaustauschchromatographie angewandt, z. B. an SE-Sephadex A25 bei pH 3,0 in Essigsäure/7 M Harnstoff mit einem NaCl-Gradienten.

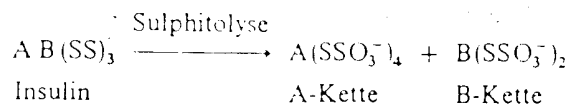
Das nach Dialyse, Gefriertrocknung und (eventuell erforderlichem) Entsalzen mittels Gelfiltration, z. B. an Sephadex G 25, oder durch isoelektrisches Umfällen erhaltene Produkt kann, falls erforderlich, durch Ionenaustauschchromatographie in schwach alkalischer Lösung, z. B. an DEAE-Sephadex A 25 bei pH 8,4, nachgereinigt werden.

Als neue Wirkstoffe seien im einzelnen genannt:

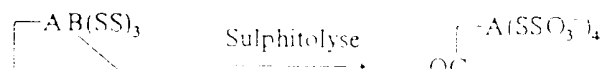
$N^{\alpha}A1, N^{\epsilon}B29$ -Oxalylinsulin (Rind),  
 $N^{\alpha}A1, N^{\epsilon}B29$ -Succinylinsulin (Rind),  
 $N^{\alpha}A1, N^{\epsilon}B29$ -Glutarylinsulin (Rind),  
 $N^{\alpha}A1, N^{\epsilon}B29$ -Adipoylinsulin (Rind, Schaf),  
 $N^{\alpha}A1, N^{\epsilon}B29$ -Pimeloylinsulin (Rind),  
 $N^{\alpha}A1, N^{\epsilon}B29$ -Suberoylinsulin (Rind),  
 $N^{\alpha}A1, N^{\epsilon}B29$ -Azelaoylinsulin (Rind),  
 $N^{\alpha}A1, N^{\epsilon}B29$ -Sebacoylinsulin (Rind, Schwein),  
 $N^{\alpha}A1, N^{\epsilon}B29$ -Undecandioylinsulin (Rind),  
 $N^{\alpha}A1, N^{\epsilon}B29$ -Dodecandioylinsulin (Rind),  
 $N^{\alpha}A1, N^{\epsilon}B29$ -Tridecandioylinsulin (Rind),  
 $N^{\alpha}A1, N^{\epsilon}B29$ -(N,N'-Bis-tert.-butyloxycarbonyl)-L-cystinylinsulin (Rind),  
 $N^{\alpha}A1, N^{\epsilon}B29$ -L-Cystinylinsulin (Rind),  
 $N^{\alpha}A1, N^{\epsilon}B29$ -N-Benzoyloxycarbonyl-L-glutamylinsulin (Rind),  
 $N^{\alpha}A1, N^{\epsilon}B29$ -L-Glutamylinsulin (Rind).

Chemischer Strukturbeweis für die kovalent vernetzten Insulinderivate

a) Insulin und alle Derivate, in denen Aminogruppen monofunktionell substituiert sind, geben bei der Spaltung der Disulfidbindungen, z. B. durch oxydative Sulphitolyse (L. Bailey und R. D. Cole, J. Biol. Chemistry, 234, 1733, [1959]), die getrennten A- und B-Ketten als S-Sulfonate. Vereinfachtes Schema:



Bei einem mittels einer bifunktionellen Brücke zwischen Glycin<sup>A1</sup> und Phenylalanin<sup>B1</sup> oder Lysin<sup>B29</sup> verknüpften Insulinderivat darf nur ein Kettenderivat nach der Spaltung auftreten:



Alle Präparate (Beispiele 1 bis 4, 6 bis 9) wurden nach erwartungsgemäß zwei Banden (A- und B-Kette) aufgetrennt. Die Banden wurden durch Gelchromatographie in schwach alkalischer Lösung (pH 8,4) nachgereinigt. Die Banden wurden durch Gelchromatographie in schwach alkalischer Lösung (pH 8,4) nachgereinigt. Die Banden wurden durch Gelchromatographie in schwach alkalischer Lösung (pH 8,4) nachgereinigt.

schen Glycin<sup>A1</sup> und Phenylalanin<sup>B1</sup> befindet, gelang durch enzymatischen Abbau der vernetzten Ketten-derivate mittels Trypsin und wird durch Endgruppenbestimmung bestätigt.

Adipoyl-A-ketten-tetra-S-sulfonat-B-ketten-bis-S-sulfonat wurde mit Trypsin nach S. S. Wang und F. H. Carpenter, Biochemistry, 6, 215 (1967), gespalten. Die Spaltprodukte wurden nach der Gefriertrocknung durch Papierelektrophorese bei pH 2 (2,4 M Ameisensäure/7 M Harnstoff) aufgetrennt (s. Fig. 1, Nr. 3).

Es wurden nur die zwei in der folgenden Tabelle angegebenen Spaltpeptide gefunden. Alle anderen vernetzten Insuline (Beispiele 1 bis 4 und 6 bis 9) gaben bei der elektrophoretischen Analyse und Endgruppenbestimmung gleiche Resultate.

Die nun folgende Tabelle zeigt die Aminosäurezusammensetzung des aus Adipoylinsulin durch oxydative Sulphitolyse erhaltenen Derivates N<sup>A1</sup>, N<sup>B29</sup>-Adipoyl-A-ketten-tetra-S-sulfonat-B-ketten-bis-S-sulfonat (A—Ad—B) und der daraus gewonnenen tryptischen Spaltpeptide N<sup>A1</sup>, N<sup>B29</sup>-Adipoyl-A-ketten-tetra-S-sulfonat-B (23 bis 30) [Bezeichnung: A—Ad—B (23 bis 30)] und B (1 bis 22)-bis-S-sulfonat [Bezeichnung: B (1 bis 22)].

Aminosäureanalyse nach Moore und Stein, Hydrolysendauer: 48 Stunden, bei 110°C. Alle Werte sind unkorrigiert und bezogen auf Glycin.

Aminosäure	A—Ad—B	A—Ad—B (23 bis 30)	B (1 bis 22)
LYS	1,08	0,97	0
HIS	2,05	0	+
ARG	1,04	0	1,16
ASP	3,43	1,95	0,81
THR	1,13	1,07	1,69
SER	2,80	1,73	1,28
GLU	6,80	3,72	1,34
PRO	1,48	+	0
GLY	4,00	2,00	2,00
ALA	3,28	2,00	0,90
Halbcystin	4,72	3,61	+
VAL	5,06	1,70	4,05
ILE	0,70	0	0
LEU	6,33	1,91	3,70
TYR	4,10	2,68	0,71
PHE	3,14	2,03	1,50

Das Zeichen + bedeutet vorhanden, jedoch nicht quantitativ bestimmt.

B (23 bis 30) = Aminosäuresequenz 23 bis 30 der B-Kette.  
B (1 bis 22) = Aminosäuresequenz 1 bis 22 der B-Kette.

- den hieraus durch Trypsinabbau erhaltenen Spaltpeptiden und
- den aus Insulin-B-Ketten-S-sulfonat mit Trypsin erhaltenen Spaltpeptiden. B (1 bis 22) (links) und B (23 bis 29) (rechts).

Angefärbt wurde hierbei mit diazotierter Sulfanilsäure. Die Pfeilmarkierung soll die Startlinie der Elektrophoresen markieren.

Die Fig. 2 zeigt das Elutionsdiagramm der Gelchromatographie von etwa 600 mg rohem Azelaoylinsulin (Beispiel 8) an einer Säule (Dimensionen: 5 × 150 cm) mit Sephadex G-50 fine in 10%iger Essigsäure. Durchlaufgeschwindigkeit 100 ml/Minute, Fraktionen zu 12 ml.

Abszisse: Fraktionsnummer.

Ordinate: Extinktion bei 254 nm.

Fraktion 1 enthält oligomere, Fraktion 2 hauptsächlich dimere, Fraktion 3 monomere Insulinderivate. Die Elutionsdiagramme der Gelchromatographie der anderen bifunktionell vernetzten Insulinderivate zeigen einen ähnlichen Verlauf.

Fig. 3 zeigt das Elutionsdiagramm der Ionenaustauschchromatographie von 320 mg rohem Suberoylinsulin (Beispiel 7, Fraktion 3) an einer Säule (Dimensionen 1,5 × 45 cm) mit SE-Sephadex bei pH 3,0. Linearer Natriumchloridgradient, Puffer siehe Angaben bei Beispiel 1. Durchlaufgeschwindigkeit 30 bis 35 ml/Minute, Fraktionen zu 6,8 ml, Extinktionsmessung bei 254 nm.

Abszisse: Fraktionsnummer.

Ordinate: NaCl-Konzentration in Mol/l.

Fraktion mit dem Maximum bei Fraktionsnummer 60: Gesuchtes Insulinderivat mit Brücke zwischen Glycin<sup>A1</sup> und Lysin<sup>B29</sup>. Die Elutionsdiagramme der Ionenaustauschchromatographie der anderen bifunktionell vernetzten Insulinderivate zeigen einen ähnlichen Verlauf.

Fig. 4 zeigt das UV-Spektrum von amorphem Insulin (---), Konzentration = 0,767 mg/ml, und Glutarylinsulin (—), Konzentration = 0,636 mg/ml, in 0,05 M Ammoniumbicarbonatlösung, pH 8,2.

Ordinate: Extinktion.

Abszisse: Wellenlänge in nm (Nanometer).

Die neuen Wirkstoffe weisen eine blutglucose-senkende Wirkung auf. Sie eignen sich deshalb zur Behandlung von Diabetikern im allgemeinen und besonders solchen, die infolge Antikörperbildung gegen Rinder- und/oder Schweineinsulin hohe Dosen herkömmlicher Insulinpräparate benötigen, deren Bedarf aber erfahrungsgemäß nach Umstellung auf ein neues Präparat, gegen das keine Antikörper gebildet werden, durch niedrigere Dosen zufriedenstellend gedeckt ist.

Die neuen Wirkstoffe können in bekannter Weise in die üblichen Formulierungen übergeführt werden, wie Lösungen und Suspensionen, besonders Kristall-

1. A-Kette (links) und B-Kette (rechts) in der S-Sulfonatform.

Verfahren zur Herstellung von Insulinderivaten

Insulin senkt die Blutzucker von Ratten. Diese

glucosesenkung bei Ratten nach subcutaner Injektion von Präparaten mit unbekannter Insulinwirksamkeit und der Blutglucosesenkung nach subcutaner Injektion von Insulin mit bekanntem Wirkstoffgehalt wird die blutglucosewirksame Insulinaktivität der Insulinderivate ermittelt. Einzelheiten s. H. Zahn, E. Drechsel und W. Puls: Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem., 349, 385 bis 389 (1968).

In der nun folgenden Tabelle wird die blutglucosewirksame Insulinaktivität einiger erfindungsgemäßer Verbindungen in Prozent vom Insulinstandard (25,4 IE/mg) angegeben:

Wirkstoff	Blutglucose- wirksame Insulinakti- vität 1 mg in Prozent vom Insulin- standard (25,4 IE/mg)
N <sup>2</sup> A <sup>1</sup> ,N <sup>ε</sup> B <sup>29</sup> -Oxalylinsulin (Rind)	52
N <sup>2</sup> A <sup>1</sup> ,N <sup>ε</sup> B <sup>29</sup> -Glutarylinsulin (Rind)	32
N <sup>2</sup> A <sup>1</sup> ,N <sup>ε</sup> B <sup>29</sup> -Adipoylinsulin (Rind)	41
N <sup>2</sup> A <sup>1</sup> ,N <sup>ε</sup> B <sup>29</sup> -Pimeloylinsulin (Rind)	35
N <sup>2</sup> A <sup>1</sup> ,N <sup>ε</sup> B <sup>29</sup> -Suberoylinsulin (Rind)	100
N <sup>2</sup> A <sup>1</sup> ,N <sup>ε</sup> B <sup>29</sup> -Azelaoylinsulin (Rind)	100
N <sup>2</sup> A <sup>1</sup> ,N <sup>ε</sup> B <sup>29</sup> -Sebacoylinsulin (Rind)	61

### Beispiel 1

#### N<sup>2</sup>A<sup>1</sup>,N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-Oxalylinsulin (Rind)

Eine Lösung von 640 mg (100 µMol) kristallinem Rinderinsulin und 150 µl Triäthylamin in 75 ml Dimethylsulfoxid wurde unter Rühren bei Raumtemperatur tropfenweise mit einer Lösung von 39,8 mg (120 µMol) Oxalsäure-bis-p-nitrophenylester in 5 ml Dimethylsulfoxid innerhalb von 4 Stunden versetzt. Die Reaktionslösung stand noch 60 Stunden bei Raumtemperatur und wurde dann zunächst 2 Stunden gegen fließendes Wasser und anschließend zwei-  
mal jeweils 1 Stunde gegen 1 l 0,05 M Ammoniumbicarbonatlösung dialysiert. Die Lösung wurde mit verdünnter HCl auf pH 4,9 angesäuert, das ausgefallene Protein abzentrifugiert und mit Wasser gewaschen. Das feuchte Produkt wurde in 3 ml Eisessig und 17 ml Wasser gelöst und an einer Säule (5 × 150 cm) mit Sephadex G-50 fine in 10%iger Essigsäure chromatographiert. Das Eluat wurde in 3 Fraktionen (vgl. Fig. 2) viermal gegen je 1 l dest. Wasser dialysiert und anschließend lyophilisiert.

#### Auswaagen

Fraktion 1..... 70 mg

410 mg der Fraktion 3 wurden in 3 ml 1,5 M Essigsäure 7 M Harnstoff 0,05 M NaCl (pH 3,0) gelöst und auf einer Säule (15 × 45 cm) mit Sephadex G-25

Die Elution erfolgte mittels eines linearen Gradienten aus 250 ml Startpuffer und 250 ml Zulaufpuffer, der die gleiche Zusammensetzung wie der Startpuffer besaß, jedoch 0,2 M an NaCl war. Das Eluat unter dem Maximum (schraffierter Teil, vgl. Fig. 3) wurde dreimal je 1 Stunde gegen 1 l dest. Wasser dialysiert und lyophilisiert. Der Rückstand wurde durch Chromatographie an einer Säule (3 × 60 cm) mit Sephadex G-25 in 0,05 M Ammoniumbicarbonatlösung von restlichem Salz und Harnstoff befreit und das Eluat lyophilisiert.

Ausbeute: 98,2 mg (15% der Theorie).

$\epsilon_{278} = 5490$  (in 0,05 M Ammoniumbicarbonatlösung, pH 8,2) (vgl. Fig. 4).

Papierelektrophorese bei pH 2: Einheitlich.

$R_{fns}$  (elektrophoretische Beweglichkeit, bezogen auf Insulin) = 0,74.

Freie Aminogruppen (Dansylchloridmethode nach W. R. Gray, Methods in Enzymology, Bd. 11, 139, [1967]): Phenylalanin Oxalylinsulin kristallisiert aus zinkionenhaltigem Citratpuffer (J. Schlichtkrull, Acta Chem. Scand. 10, 1455 [1956]) in Form von kleinen Prismen.

### Beispiel 2

#### N<sup>2</sup>A<sup>1</sup>,N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-Succinylinsulin (Rind)

640 mg krist. Rinderinsulin wurden innerhalb von 3 Stunden mit 43,2 mg (120 µMol) Bernsteinsäurebis-p-nitrophenylester unter den im Beispiel 1 beschriebenen Bedingungen umgesetzt. Aufarbeitung und Gelchromatographie erfolgten ebenfalls wie im Beispiel 1 beschrieben.

#### Auswaagen

Fraktion 1..... 90 mg  
Fraktion 2..... 105 mg  
Fraktion 3..... 411 mg  
(64,2% der Theorie)

410 mg der Fraktion 3 wurden, wie bei Beispiel 1 beschrieben, an SE-Sephadex chromatographiert und aufgearbeitet. Die Hauptfraktion (schraffiert, vgl. Fig. 3) gab nach der Chromatographie an Sephadex G-25 139 mg (21,7% der Theorie) Succinylinsulin.

$\epsilon_{278} = 5540$  (in 0,05 M Ammoniumbicarbonatlösung, pH 8,2).

Papierelektrophorese bei pH 2: Einheitlich.

$R_{fns} = 0,77$ .

Freie Aminogruppen: Phenylalanin.

Kristallform: Sphärische Partikeln.

### Beispiel 3

#### N<sup>2</sup>A<sup>1</sup>,N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-Glutarylinsulin (Rind)

640 mg krist. Rinderinsulin wurden mit 44,8 mg (120 µMol) Glutarsäure-bis-p-nitrophenylester unter den im Beispiel 1 beschriebenen Bedingungen umgesetzt. Aufarbeitung und Gelchromatographie erfolgten ebenfalls wie im Beispiel 1 beschrieben.

Fraktion 1..... 100 mg  
Fraktion 2..... 130 mg  
Fraktion 3..... 330 mg  
(61,6% der Theorie)

330 mg der Fraktion 3 wurden in 3 ml 1,5 M Essigsäure 7 M Harnstoff 0,05 M NaCl (pH 3,0) gelöst und auf einer Säule (15 × 45 cm) mit Sephadex G-25

aufgearbeitet. Nach dem Entsalzen durch Gelfiltration an Sephadex G-25, gefolgt von isoelektrischem Umfällen bei pH 4,8, wurden aus der Hauptfraktion (vgl. Fig. 2) 110,3 mg (17,3% der Theorie) Glutarylinsulin erhalten.

$r_{278} = 5400$  (in 0,05 M Ammoniumbicarbonatlösung).

Papierelektrophorese bei pH 2: Einheitlich.

$R_{fns} = 0,74$ .

Freie Aminogruppen: Phenylalanin.

Kristallform: Verfilzte kleine Nadeln.

#### Beispiel 4

##### $N^{\alpha}Al, N^{\epsilon}B^{29}$ -Adipoylinsulin (Rind)

a) 1,27 g (200  $\mu$ Mol) krist. Rinderinsulin wurden in 140 ml Dimethylsulfoxid in Gegenwart von 0,3 ml Triäthylamin unter Rühren bei Raumtemperatur tropfenweise mit einer Lösung von 93,2 mg (240  $\mu$ Mol) Adipinsäure-bis-p-nitrophenylester in 5 ml Dimethylsulfoxid versetzt. Nach 60stündigem Stehen bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung wie bei Beispiel 1 beschrieben aufgearbeitet. Nach der Gelchromatographie an Sephadex G-50 fine in 10%iger Essigsäure wurden erhalten:

Fraktion 1.....	304 mg
Fraktion 2.....	335 mg
Fraktion 3.....	587 mg
	(46,2% der Theorie)

580 mg der Fraktion 3 wurden in zwei gleichen Anteilen an SE-Sephadex chromatographiert, wie im Beispiel 1 beschrieben. Die Hauptfraktionen (vgl. Fig. 3) wurden nach der Gefriertrocknung vereinigt und durch Gelfiltration (s. Beispiel 1) entsalzt. Ausbeute: 294 mg (23% der Theorie) Adipoylinsulin.  $r_{276} = 5650$  (in 0,05 M Ammoniumbicarbonatlösung, pH 8,2).

Papierelektrophorese bei pH 2: Einheitlich.

$R_{fns} = 0,73$ .

Freie Aminogruppe: Phenylalanin.

Kristallform: Kleine Nadeln sowie sphärische Partikeln.

b) Zu einer Lösung von 120 mg (18,7  $\mu$ Mol) krist. Rinderinsulin in 15 ml Dimethylsulfoxid und 30  $\mu$ l Triäthylamin wurden innerhalb von 2 Stunden 7,8 mg (20  $\mu$ Mol) Adipinsäure-bis-p-nitrophenylester in 2,5 ml Dimethylsulfoxid unter Rühren getropft. Anschließend wurden weitere 7,8 mg Ester in 2,5 ml Dimethylsulfoxid innerhalb von einer Stunde zugegetropft. Die Reaktionslösung wurde sofort mit Methanol/Äther versetzt, das ausgefallene Insulinderivat mit Methanol/Äther (1:9) gewaschen und kurz im Vakuum getrocknet. Dann wurde in einem Gemisch aus 1 ml Eisessig und 9 ml Wasser gelöst und auf

Auswaagen	
Fraktion 1.....	29 mg
Fraktion 2.....	111 mg
Fraktion 3.....	331 mg
	(51,7% der Theorie)

#### Beispiel 5

##### $N^{\alpha}Al, N^{\epsilon}B^{29}$ -Adipoylinsulin (Schaf)

Zu einer Lösung von 320 mg krist. Schafinsulin (50  $\mu$ Mol) in 35 ml Dimethylsulfoxid und 75  $\mu$ l Triäthylamin wurde unter Rühren bei Raumtemperatur eine Lösung von 23,3 mg (60  $\mu$ Mol) Adipinsäure-bis-p-nitrophenylester in 4 ml Dimethylsulfoxid innerhalb von 4 Stunden getropft. Die Reaktionsmischung stand noch 48 Stunden bei Raumtemperatur und wurde dann wie im Beispiel 1 angegeben aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde an Sephadex (Säule:  $3 \times 200$  cm) wie im Beispiel 1 chromatographiert.

##### Auswaagen

Fraktion 1.....	88 mg
Fraktion 2.....	74 mg
Fraktion 3.....	94 mg
	(29,4% der Theorie)

Die Fraktion 3 enthielt nach der quantitativen Papierelektrophorese 59%  $N^{\alpha}Al, N^{\epsilon}B^{29}$ -Adipoylinsulin.

#### Beispiel 6

##### $N^{\alpha}Al, N^{\epsilon}B^{29}$ -Pimeloylinsulin (Rind)

640 mg krist. Rinderinsulin wurden mit 48,2 mg (120  $\mu$ Mol) Pimelinsäure-bis-p-nitrophenylester unter den im Beispiel 1 beschriebenen Bedingungen umgesetzt. Nach 44 Stunden wurde die Reaktionsmischung aufgearbeitet und das Rohprodukt chromatographiert.

##### Auswaagen

Fraktion 1.....	194 mg
Fraktion 2.....	111 mg
Fraktion 3.....	288 mg
	(45% der Theorie)

280 mg der Fraktion 3 wurden, wie im Beispiel 1 beschrieben, an SE-Sephadex chromatographiert. Das aus der Hauptfraktion (vgl. Abb. 3) isolierte Produkt wurde an Sephadex G-25 entsalzt.

Ausbeute: 132 mg (20,6% der Theorie).

$r_{278} = 5970$  (in 0,05 M Ammoniumbicarbonatlösung, pH 8,2).

Elektrophoretische Reinheit: 95%.

$R_{fns} = 0,73$ .

Freie Aminogruppe: Phenylalanin.

Kristallform: Verfilzte Nadeln.

#### Beispiel 7

##### $N^{\alpha}Al, N^{\epsilon}B^{29}$ -Suberoylinsulin (Rind)

640 mg krist. Rinderinsulin wurden mit 49,9 mg (120  $\mu$ Mol) Krist. Suberinsäure-bis-p-nitrophenylester

Auswaagen	
Fraktion 1.....	122 mg
Fraktion 2.....	331 mg
Fraktion 3.....	331 mg
	(51,7% der Theorie)

Das Rohprodukt wurde an SE-Sephadex chromatographiert. Die

Hauptfraktion (s. Fig. 3) wurde an Sephadex G-25 entsalzt, anschließend bei pH 4,8 isoelektrisch umgefällt und erneut lyophilisiert.

Ausbeute: 138,8 mg (21,6% der Theorie).

$\epsilon_{278} = 5110$  (in 0,05 M Ammoniumbicarbonatlösung, pH 8,2).

Elektrophoretische Reinheit (pH 2): 98%.

$R_{1/2} = 0,74$ .

Freie Aminogruppen: Phenylalanin.

Kristallform: Kleine Nadeln.

### Beispiel 8

$N^{A1}, N^{B29}$ -Azelaoylinsulin (Rind)

640 mg krist. Rinderinsulin wurden mit 51,6 mg (120  $\mu$ Mol) Azelainsäure-bis-p-nitrophenylester umgesetzt, wie bei Beispiel 1 beschrieben. Nach der Gelfiltration (s. Fig. 2) wurden erhalten:

Fraktion 1	166 mg
Fraktion 2	121 mg
Fraktion 3	311 mg (48% der Theorie)

300 mg der Fraktion 3 wurden an SE-Sephadex chromatographiert, wie bei Beispiel 1 beschrieben. Die Aufarbeitung der Hauptfraktion (vgl. Fig. 3) gab nach dem Entsalzen 134,3 mg Azelaoylinsulin (21% der Theorie).

$\epsilon_{278} = 6060$  (in 0,05 M Ammoniumbicarbonatlösung).

Elektrophoretische Reinheit (pH 2): 94%.

$R_{1/2} = 0,77$ .

Freie Aminogruppen: Phenylalanin.

Kristallform: Kleine Nadeln.

### Beispiel 9

$N^{A1}, N^{B29}$ -Sebacoylinsulin (Rind)

640 mg krist. Rinderinsulin wurden mit 53,3 mg (120  $\mu$ Mol) Sebacinsäure-bis-p-nitrophenylester umgesetzt, wie bei Beispiel 1 beschrieben. Abweichend erfolgte die Aufarbeitung so, daß das Reaktionsprodukt nach der Dialyse durch Gefriertrocknung isoliert wurde. Das Rohprodukt wurde in 4 ml Eisessig und 16 ml Wasser gelöst und wie im Beispiel 1 chromatographiert.

#### Auswaagen

Fraktion 1	175 mg
Fraktion 2	143 mg
Fraktion 3	278 mg (43% der Theorie)

$\epsilon_{278} = 5500$ .

Papierelektrophorese bei pH 2: Einheitlich.

$R_{1/2} = 0,78$ .

### Beispiel 10

$N^{A1}, N^{B29}$ -Sebacoylinsulin (Schwein)

640 mg krist. Schweineinsulin wurden mit 53,3 mg (120  $\mu$ Mol) Sebacinsäure-bis-p-nitrophenylester umgesetzt, wie im Beispiel 1 beschrieben. Nach 20stündigem Stehen bei Raumtemperatur wurde aufgearbeitet.

#### Auswaagen nach der Gelfiltration

Fraktion 1	190 mg
Fraktion 2	139 mg
Fraktion 3	280 mg (43,7% der Theorie)

Fraktion 3 enthielt nach der quantitativen elektrophoretischen Analyse 70% Sebacoylinsulin.

### Beispiel 11

$N^{A1}, N^{B29}$ -(Bis-N,N'-tert.-butyloxycarbonyl)-cystinylinsulin (Rind)

a) Zu einer Lösung von 640 mg krist. Rinderinsulin in 75 ml Dimethylsulfoxid und 150  $\mu$ l Triäthylamin wurde unter Rühren bei Raumtemperatur eine Lösung von 95,8 mg (120  $\mu$ Mol) N,N'-Bis-tert.-butyloxycarbonyl-cystin-2,4,5-trichlorphenylester in 5 ml Dimethylsulfoxid innerhalb von 5 Stunden unter Rühren getropft. Nach 22stündigem Stehen wurde die Reaktionsmischung, wie im Beispiel 1 beschrieben, aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde an Sephadex G-50 in 10%iger Essigsäure chromatographiert.

#### Auswaagen

Fraktion a 1	191 mg
Fraktion a 2	132 mg
Fraktion a 3	261 mg (40,8% der Theorie)

b) Die Reaktion wurde unter gleichen Bedingungen wie im Beispiel 11a) geführt, jedoch unter Verwendung von 110  $\mu$ l N-Methylmorpholin als Base.

#### Auswaagen

Fraktion b 1	206 mg
Fraktion b 2	159 mg
Fraktion b 3	272 mg (42,5% der Theorie)

250 mg der Fraktion a 3 wurden, wie bei Beispiel 1 beschrieben, an SE-Sephadex aufgetrennt. Die Hauptfraktion wurde durch Chromatographie an Sephadex G-25 entsalzt.

Ausbeute: 103,6 mg (16,5% der Theorie).

$\epsilon_{278} = 5400$  (in 0,05 M Ammoniumbicarbonatlösung, pH 8,2).

an b 3 91,8 mg (14,2% der Theorie) Bis-tert.-butyloxycarbonyl-cystinylinsulin erhalten

$\epsilon_{278} = 5000$ .



## Beispiel 12

 $N^{\alpha}A^1, N^{\epsilon}B^{29}$ -Cystinyl-insulin (Rind)

40 mg  $N^{\alpha}A^1, N^{\epsilon}B^{29}$ -(Bis-butyloxycarbonyl)-cystinyl-insulin (Beispiel 11) wurden 15 Stunden im Vakuum über  $P_2O_5$  und KOH getrocknet. Dann wurde im Zentrifugenröhrchen mit 0,3 ml Trifluoressigsäure versetzt und die Lösung 1 Stunde bei Raumtemperatur gehalten. Das Protein wurde anschließend mit 10 ml absolutem Äther ausgefällt, der Rückstand abzentrifugiert und mehrfach mit Äther gewaschen.

Ausbeute nach Trocknen im Vakuum über  $P_2O_5$  und KOH: 42 mg (etwa 96% der Theorie).

$\epsilon_{278} = 5560$  (in 0,05 M Ammoniumbicarbonatlösung).

Elektrophoretische Reinheit (bei pH 2): Einheitlich.

$R_{fns} = 1,0$ .

## Beispiel 13

Darstellung von  $N^{\alpha}A^1, N^{\epsilon}B^{29}$ -(N-Benzoyloxycarbonyl)-glutamyl-insulin (Rind)

Zu einer Lösung von 640 mg krist. Rinderinsulin in 75 ml Dimethylsulfoxid und 110  $\mu$ l N-Methylmorpholin wurde innerhalb von 5 Stunden unter Rühren bei Raumtemperatur eine Lösung von 62,7 mg (120  $\mu$ Mol) N-Benzoyloxycarbonyl-glutaminsäure- $\alpha, \gamma$ -bis-p-nitrophenylester getropft. Nach 22stündigem Stehen wurde wie im Beispiel 1 aufgearbeitet und anschließend chromatographiert.

## Auswaagen

Fraktion 1	106 mg
Fraktion 2	129 mg
Fraktion 3	257 mg (40,2% der Theorie)

250 mg der Fraktion 3 wurden, wie bei Beispiel 1 beschrieben, an SE-Sephadex chromatographiert. Nach dem Entsalzen durch Chromatographie an Sephadex G-25 wurden erhalten: 105 mg (16,4% der Theorie).

Elektrophoretische Reinheit (pH 2): 95%.

$R_{fns} = 0,76$ .

Freie Aminogruppen: Phenylalanin.

## Beispiel 14

 $N^{\alpha}A^1, N^{\epsilon}B^{29}$ -Undecandioylinsulin (Rind)

640 mg krist. Rinderinsulin wurden mit 55,0 mg (120  $\mu$ Mol) Undecandisäure-bis-p-nitrophenylester umgesetzt, wie bei Beispiel 1 beschrieben, die Reaktionslösung wurde jedoch bereits 18 Stunden nach Zugabe des Esters aufgearbeitet. Nach der Gelfiltration (s. Fig. 2) wurden erhalten:

Fraktion 1

280 mg der Fraktion 3 wurden an einer Säule (2,7 x 40 cm) mit SP-Sephadex chromatographiert, wie bei Beispiel 1 beschrieben, die Puffervolumina

beiden Pufferlösungen betrugen jedoch jeweils 700 ml. Die Aufarbeitung der Hauptfraktion (vgl. Fig. 3) gab nach dem Entsalzen 139 mg Undecandioylinsulin (22,5% der Theorie).

Papierelektrophorese bei pH 2: Einheitlich.

$\epsilon_{278} = 5390$  (in 0,05 M Ammoniumbicarbonatlösung, pH 8,2).

$R_{fns} = 0,74$ .

Freie Aminogruppen: Phenylalanin.

Kristallform: Sphärische Partikeln.

## Beispiel 15

 $N^{\alpha}A^1, N^{\epsilon}B^{29}$ -Dodecandioylinsulin (Rind)

640 mg krist. Rinderinsulin wurden mit 56,7 mg (120  $\mu$ Mol) Dodecandisäure-bis-p-nitrophenylester umgesetzt, wie bei Beispiel 1 beschrieben, die Reaktionslösung wurde jedoch 18 Stunden nach Zugabe des Esters aufgearbeitet. Nach der Gelfiltration wurden erhalten:

Fraktion 1	140 mg
Fraktion 2	157 mg
Fraktion 3	276 mg (43,1% der Theorie)

260 mg der Fraktion 3 wurden an einer Säule (2,7 x 40 cm) mit SP-Sephadex chromatographiert, wie bei Beispiel 1 beschrieben, die Puffervolumina betrugen jedoch jeweils 700 ml. Die Aufarbeitung der Hauptfraktion (vgl. Fig. 3) gab nach dem Entsalzen 108 mg (17,9% der Theorie) Dodecandioylinsulin.

$\epsilon_{278} = 5870$  (in 0,05 M Ammoniumbicarbonatlösung, pH 8,2).

Papierelektrophorese (bei pH 2): Einheitlich.

$R_{fns} = 0,73$ .

Freie Aminogruppen: Phenylalanin.

Kristallform: Sphärische Partikeln.

## Beispiel 16

 $N^{\alpha}A^1, N^{\epsilon}B^{29}$ -Tridecandioylinsulin (Rind)

640 mg krist. Rinderinsulin wurden mit 58,4 mg (120  $\mu$ Mol) Tridecandisäure-bis-p-nitrophenylester umgesetzt, wie bei Beispiel 1 beschrieben, die Reaktionslösung wurde jedoch 18 Stunden nach Zugabe des Esters aufgearbeitet. Nach der Gelfiltration wurden erhalten:

Fraktion 1	143 mg
Fraktion 2	154 mg
Fraktion 3	297 mg (46,4%)

290 mg der Fraktion 3 wurden an einer Säule (2,7 x 40 cm) mit SP-Sephadex chromatographiert, wie bei Beispiel 1 beschrieben, die Puffervolumina

Papierelektrophorese (bei pH 2): Einheitlich.

$R_{fns} = 0,75$ .

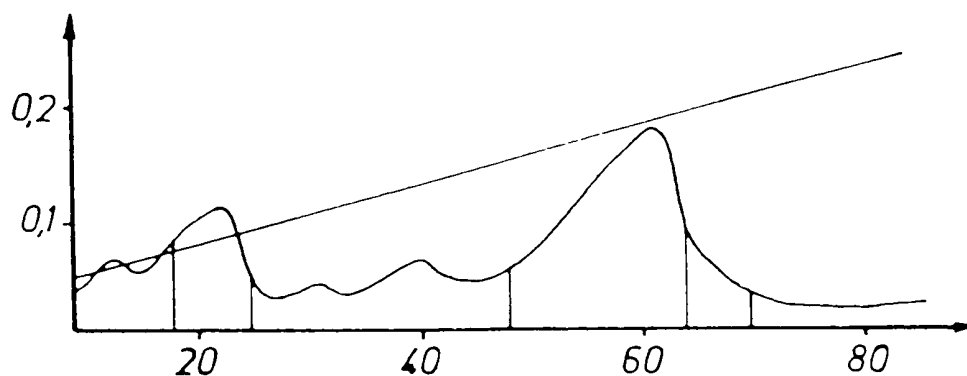
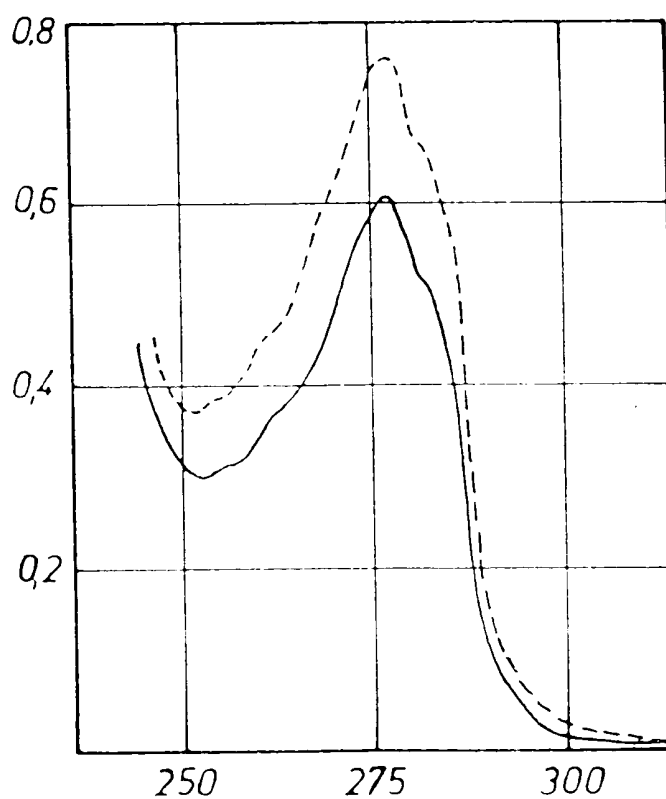


FIG. 3



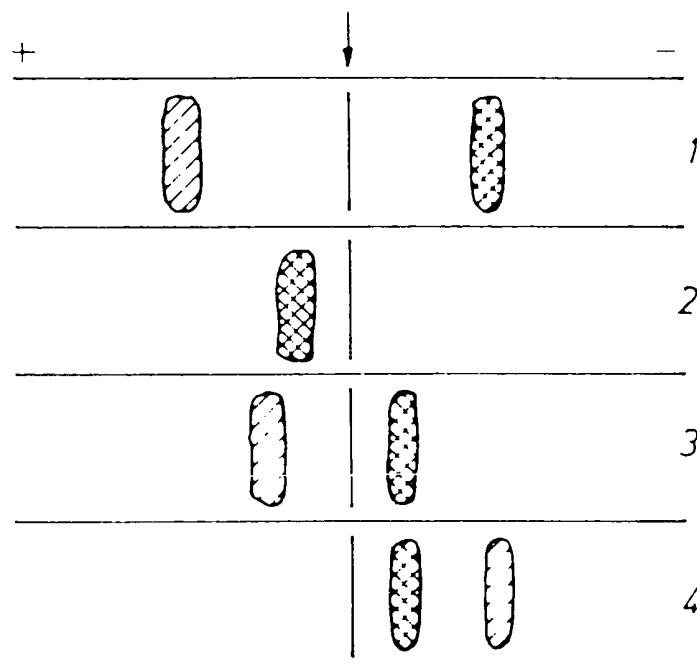


FIG. 1

